杠柳杀虫组分 F3-28 对东方粘虫和小地老虎幼虫中肠消化酶活性的影响

何 玲, 赵 娟, 师宝君, 胡兆农, 吴文君*
(西北农林科技大学农药研究所, 陕西杨凌 712100)

摘要: F3-28 是从杀虫植物杠柳 *Periploca sepium* Bunge 根皮中分离的一个具有杀虫活性的馏分, 其主要成分为杠柳苷 A、杠柳苷 E 和杠柳苷 X。为了探索 F3-28 的初始作用部位, 为深入研究其作用机理奠定基础, 本研究采用经典的昆虫消化酶活性测定方法, 比较了 F3-28 对小地老虎 *Agrotis ypsilon* 和东方粘虫 *Mythimna separata* 5 龄幼虫消化酶系活性的影响。结果表明:对 F3-28 不敏感的小地老虎幼虫摄食 F3-28 后, 其中肠蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶的活性无显著变化。对 F3-28 敏感的东方粘虫幼虫摄食 F3-28 后 2, 4, 8, 10, 12, 24, 48 h, 其中肠总蛋白酶活性分别为对照组的 0.76, 2.53, 1.45, 1.88, 1.54, 1.46, 1.70 倍, 且和药物浓度呈依赖关系; 类胰蛋白酶的活性分别为对照组的 1.60, 1.75, 1.60, 1.12, 1.39, 1.16, 1.15 倍(以 BAPNA 为底物)或 1.68, 1.95, 1.53, 1.26, 1.15, 1.13, 1.14 倍(以 TAME 为底物), 且和药物浓度呈依赖关系; 类胰凝乳蛋白酶活性分别为对照组的 0.50, 1.66, 1.44, 1.18, 1.54, 1.08和 1.03 倍, 但和药物浓度无依赖关系; 淀粉酶的活性分别为对照组的 1.60, 1.35, 1.27, 1.31, 1.23 和 1.20 倍, 但和药物浓度无依赖关系; 对脂肪酶活性无明显影响。这些结果说明, 杠柳杀虫活性组分 F3-28 的作用机理可能涉及对试虫中肠蛋白酶的激活, 特别是对类胰蛋白酶的激活。

关键词: 杠柳; 植物提取物; 杀虫活性; 蛋白酶; 类胰蛋白酶; 类胰凝乳蛋白酶; 脂肪酶; 淀粉酶
中图分类号: Q965.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2010)11-1248-08

Effects of insecticidal fraction F3-28 from *Periploca sepium* on the activities of digestive enzymes in the midgut of larvae of *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* (Lepidoptera: Noctuidae)

HE Ling, ZHAO Juan, SHI Bao-Jun, HU Zhao-Nong, WU Wen-Jun* (Institute of Pesticide Science, Northwest Agricultural & Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: F3-28 is an insecticidal fraction which was isolated from the extract of *Periploca sepium* bark. In order to understand the action mechanism of the insecticidal fraction F3-28, the effects of F3-28 on the activities of proteases, trypsin-like protease, chymotrypsin-like protease, lipase and amylase in the midgut of the 5th instar larvae of *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* were studied. The results showed that after *A. ypsilon* larvae which are insensitive to F3-28 ingested this fraction, the activities of proteases, lipase and amylase in the midgut changed indistinctly. However, after *M. separata* larvae which are sensitive to F3-28 ingested this fraction, at 2, 4, 8, 10, 12, 24 and 48 h post treatment their midgut protease activity was 0.76, 2.53, 1.45, 1.88, 1.54, 1.46 and 1.70 times as high as that of the control, respectively, and their midgut trysin-like protease activity was 1.60, 1.75, 1.60, 1.12, 1.39, 1.16 and 1.15 times (BAPNA as the substrate) and 1.68, 1.95, 1.53, 1.26, 1.15, 1.13 and 1.14 times (TAME as the substrate) as high as that of the control, respectively. Similarly, after *M. separata* larvae ingested F3-28, at 2, 4, 8, 10, 12, 24 and 48 h post treatment their midgut chymotrypsin-like protease activity was 0.50, 1.66, 1.44, 1.18, 1.54, 1.08 and 1.03 times as high as that of the control, respectively, and their midgut amylase activity was 1.60, 1.35, 1.27, 1.31, 1.23 and 1.20 times as high as the control, respectively. The increase in activities of proteases and trysin-like protease in the midgut was dependent on the concentration of F3-28, but that of chymotrypsin-like protease and amylase in the midgut was not. After *M. separata* larvae ingested F3-28, their midgut lipase activity changed inconspicuously. These results imply that the insecticidal mechanism of F3-28 may be related with the activation of proteases, especially

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870344); 博士点基金项目(200807120006)
作者简介: 何玲, 女, 1984 年 12 月生, 回族, 陕西安康人, 硕士研究生, 主要从事农药毒理研究, E-mail: heling10@nwsuaf.edu.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuwenjun@nwsuaf.edu.cn
收稿日期 Received: 2009-12-29; 接受日期 Accepted: 2010-09-09

trypsin-like protease, in the larval midgut.

Key words: *Periploca sepium*; plant extract; insecticidal activity; protease; trypsin-like protease; chymotrypsin-like protease; lipase; amylase

植物源农药的研究与开发是当前农药学科较为活跃的研究方向。从农药化学的角度研究植物源农药，其主要目标是发现新型先导化合物，通过结构修饰、先导优化合成筛选新农药；从药剂毒理学的角度研究植物源农药，其主要目标则是以植物源农药活性化合物为探针，发现新的作用靶标，通过生物合理设计创制新农药。

昆虫的消化系统是昆虫对食物进行消化、吸收的主要场所，对消化系统组织结构的破坏或对消化酶系的干扰必将导致昆虫生长发育受阻乃至死亡。Telang 等(2003)在研究苦瓜蛋白酶抑制剂对棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Hübner)生长发育影响中发现，其对棉铃虫肠道蛋白酶活性抑制率高达 80%。Broadway 和 Duffey (1986) 报道大豆中胰蛋白酶抑制剂诱导美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* (Boddie)和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*(Hübner)幼虫中肠胰蛋白酶活性显著提高；付昌斌和张兴(2000)报道沙地柏提取物导致粘虫幼虫中肠蛋白酶活性显著提高，处理组比活力比对照组高 2.3 倍；张兴和赵善欢(1992)报道了川楝素对菜青虫 *Pieris rapae* 中肠蛋白酶活性有一定程度的抑制作用，而对淀粉酶和脂肪酶活性无明显影响；操海群等(2006)报道竹提取物对棉铃虫中肠蛋白酶和淀粉酶的活性均有不同程度的激活作用，而对脂肪酶活性影响不大。虽然有许多相似的报道，但是迄今除 Bt 内毒素以外，尚未有作用于昆虫消化系统的商品化杀虫剂问世。

杠柳 *Periploca sepium* Bunge 是萝藦科(Asclepiadaceae)杠柳属 *Periploca* 一种蔓生性灌木，其根皮即中药香加皮(山西植物志编辑委员会，2000)。朱九生等(2004)、史清华等(2005)报道了杠柳根皮提取物的杀虫活性。西北农林科技大学农药研究所近年来对杠柳根皮的杀虫活性成分及杀虫活性进行了较系统的研究。结果表明，杠柳根皮的杀虫活性成分对鳞翅目害虫无明显的触杀作用，但有很强的胃毒作用，中毒昆虫没有兴奋、运动失衡、痉挛和失水等神经毒剂的中毒症状，而主要表现为腹部肿胀，腹足不能正常伸缩，解剖观察发现试虫中肠破裂，肠道内容物外溢到体腔(李奕，2006)。研究结果还表明，杠柳根皮提取物对粘虫幼虫胃毒活性很高，但对同是鳞翅目的小地老虎 *Agrotis ypsilon* 幼虫没有活性，呈现明显的选择毒杀作用(赵彦超，2008)。结合症状学和组织学观察的结果，笔者推测杠柳杀虫活性成分作用于昆虫的消化系统。但这种活性成分是破坏消化道组织结构还是影响消化酶活性，尚未有研究报道。F3-28 是从杠柳根皮中分离的一个具有杀虫活性的馏分，经 HPLC/MS/MS 检测，该馏分主要含杠柳苷 A、杠柳苷 E 和杠柳苷 X(师宝君等，2009)。本研究以从杠柳根皮中分离的杀虫活性组分 F3-28 为供试药剂，比较了对东方粘虫 *Mythimna separata* 和小地老虎幼虫中肠淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶、类胰蛋白酶及类胰凝乳蛋白酶活性的影响，旨在探索杠柳活性成分的初始作用部位，为进一步研究其作用靶标奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　杠柳根皮粉：杠柳根皮粉(过 20 目筛)，由西北农林科技大学农药研究所提供。

1.1.2　试虫：小地老虎 *A. ypsilon* 和东方粘虫 *M. separata* 5 龄幼虫由西北农林科技大学农药研究所提供。

1.1.3　仪器及试剂：

主要仪器：MK3 型酶标仪(美国热电)，TGL-16G-A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)，420A 型电热恒温水箱(北京科伟永鑫实验仪器设备厂)，756 紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

主要试剂：牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G250、酪蛋白、酪氨酸、Folin-酚、α-N-苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基苯胺(BAPNA)、p-甲苯磺酰(TAME)、N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯(BTEE)，均为 Sigma 公司产品；3，5-二硝基水杨酸、可溶性淀粉及橄榄油等均为国产分析纯试剂。

1.2　活性成分提取和试虫处理方法

1.2.1　活性成分的提取与分离：15 kg 杠柳根皮粉经二氯甲烷回流提取得膏状物，再经 3 次硅胶柱层析获得杀虫活性馏分 F3-28。

1.2.2　试虫的处理：取粘虫和小地老虎 5 龄幼虫，饥饿 12 h 后供试。处理 1：点滴 1 μL 1 mg/mL 的

F3-28 的丙酮溶液于小麦或油菜叶碟上，小麦叶碟饲喂粘虫幼虫，油菜叶碟饲喂小地老虎幼虫，对照组饲喂点滴丙酮的叶碟，30 min 内取食完毕。分别于取食后 2，4，8，10，12，24，48 h 取处理及对照试虫各 24 头待用。处理 2：分别点滴 1 μL 5，2.5，1.25，0.625 mg/mL 的 F3-28 的丙酮溶液于小麦和油菜叶碟（面积约 0.5 cm × 0.5 cm）上，小麦叶碟饲喂粘虫幼虫，油菜叶碟饲喂小地老虎幼虫。对照组试虫饲喂点滴丙酮的叶蝶。取食完 12 h 后，分别取各浓度处理试虫 24 头待用。两种处理均重复 9 次。

1.3 酶液的制备

在冰盘上解剖试虫中肠（去掉围食膜），置于预冷的玻璃匀浆器中，加入 0.15 mol/L 的生理盐水（1∶5，体积比）在冰浴中匀浆。匀浆液于 4 000 r/min 冷冻离心 15 min，上清液为酶提取液。

1.4 蛋白含量的测定

蛋白含量的测定采用 Bradford（1976）的方法，以牛血清蛋白作为标准蛋白，考马斯亮蓝 G250 染色，测定酶液蛋白浓度。

1.5 蛋白酶活性测定

参照沙槎云等（1981）的方法。以偶氮酪蛋白为底物，酪蛋白以 20 mg/mL 的浓度溶于 0.15 mol/L NaCl 溶液。取酶液 0.1 mL 加入 1 mL 酪蛋白溶液中，加缓冲液使最终体积达到 4 mL，37℃ 孵育 30 min，取上清液 0.25 mL，加 folin 酚-甲 1.25 mL，folin 酚-乙 0.25 mL，在波长 425 nm 处测吸光值。

1.6 脂肪酶活性的测定

参照刘维德和齐治欧（1983）的方法。以橄榄油乳剂为底物，0.03 mol/L Tris-HCl（pH 8.8）为缓冲液，在波长 420 nm 处测吸光值。

1.7 淀粉酶活性的测定

参照 Stellmach（1992）的方法。以 0.1% 的淀粉水溶液为底物，在 0.02 mol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液中，0.1 mL 酶液与 0.2 mL 的淀粉水溶液反应，3，5-二硝基水杨酸染色，在波长 492 nm 处测吸光值。

1.8 粘虫特异性蛋白酶的测定

参照王琛柱和钦俊德（1996）和 Erlanger 等（1961）的方法。类胰蛋白酶的测定分别采用 BAPNA 和 TAME 为底物，BAPNA 以 20 mg/mL 溶于二甲基亚砜，取 40 μL 加入含中肠酶液的 1.5 mL 0.1 mol/L 反应缓冲液中，反应 20 min 后，加入 0.5 mL 30%（v/v）乙酸终止反应，在波长 405 nm 下测吸光值。TAME 以 2 mmol/L 溶于 0.15 mol/L NaCl 溶液中。在 247 nm 处测定吸光值。类胰凝乳蛋白酶的测定以 BTEE 为底物。BTEE 以 1 mmol/L 溶于含 10%（v/v）甲醇的 0.15 mol/L NaCl 溶液中，取该溶液 0.5 mL 加入 0.5 mL 含中肠液的 0.2 mol/L 反应缓冲液。在波长 256 nm 处测定吸光值。

1.9 数据统计与分析

本实验中所有数据均采用 SPSS 10.0 中文版进行处理和分析，各组酶比活力均用平均值表示，*t* 检验时不同处理间差异显著水平为 $P = 0.05$。

2 结果与分析

2.1 F3-28 对小地老虎和粘虫幼虫蛋白酶活性的影响

采用饲喂法，以 1 μg/头 F3-28 处理小地老虎和粘虫 5 龄幼虫，测定不同处理时间后中肠蛋白酶的活性，结果显示，小地老虎幼虫取食 F3-28 后 4 h 中肠蛋白酶活性略有升高，但在 10 h 后酶活性又下降（图 1：A）。粘虫幼虫取食 F3-28 后 2，4，8，10，12，24，48 h 中肠蛋白酶活性分别为对照组的 0.76，2.53，1.45，1.88，1.54，1.46，1.70 倍；取食 2 h 后，蛋白酶活性受到一定程度的抑制，但在处理后 4 h 有一个激增，然后，随着处理时间延长，粘虫蛋白酶激活的倍数没有显著变化（图 1：B）。

以不同浓度的 F3-28 处理小地老虎和粘虫 5 龄幼虫，测定处理后中肠蛋白酶的活性，结果见表 1。由表 1 可以看出，经 5，2.5，1.25，0.625 mg/mL F3-28 处理的小地老虎幼虫中肠蛋白酶活性和对照组相比差异不显著（$P > 0.05$），同样处理的粘虫幼虫中肠蛋白酶活性分别为对照的 2.10，2.06，1.58，1.56 倍，经 *t* 检验，处理组与对照组差异显著（$P < 0.05$）。这些结果表明 F3-28 对粘虫幼虫蛋白酶的激活具有一定的浓度依赖关系。

2.2 F3-28 对粘虫类胰蛋白酶活性的影响

以 BAPNA 为底物，粘虫幼虫处理后 2，4，8，10，12，24，48 h 中肠类胰蛋白酶活性分别为对照组的 1.60，1.75，1.60，1.12，1.39，1.16，1.15 倍，其中处理后 4 h 激活倍数最高（图 2：A）；以 TAME 为底物，粘虫幼虫处理后 2，4，8，10，12，24，48 h 类胰蛋白酶活性分别为对照组的 1.68，1.95，1.53，1.26，1.15，1.13，1.14 倍，其中处理后 4 h 激活倍数最高（图 2：B）。

不同浓度 F3-28 对粘虫 5 龄幼虫中肠类胰蛋白酶的影响见表 2。类胰蛋白酶活性与处理浓度表现一定的浓度依赖性，在 5 mg/mL 浓度下，活性最高。

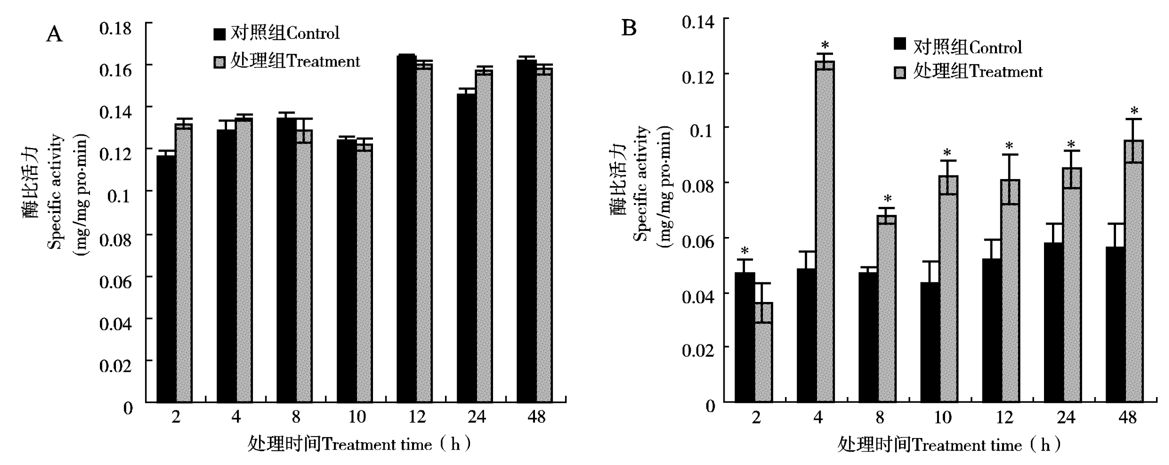


图 1　F3-28 处理小地老虎(A)和粘虫(B)5 龄幼虫不同时间后中肠蛋白酶活性的变化

Fig. 1　Effect of F3-28 on protease activity in the midgut of 5th instar larvae of *Agrotis ypsilon*（A）and *Mythimna separata*（B）

柱上标星号者表示对照与处理间差异显著($P<0.05$)；下同。The asterisk above a bar indicates significant difference between the treatment and the control（$P<0.05$）. The same below.

表 1　不同浓度 F3-28 对小地老虎和粘虫 5 龄幼虫中肠蛋白酶活性的影响

Table 1　Effect of F3-28 on protease activity in the midgut of 5th instar larvae of *Agrotis ypsilon* and *Mythimna separata* at different concentrations

处理浓度 Treatment concentration (mg/mL)	小地老虎 *A. ypsilon* 酶比活力 Specific activity (mg/mg pro · min)	小地老虎 *A. ypsilon* 比值 Ratio	粘虫 *M. separata* 酶比活力 Specific activity (mg/mg pro · min)	粘虫 *M. separata* 比值 Ratio
5	0.058 ± 0.006	0.97	0.105 ± 0.005 *	2.10
2.5	0.059 ± 0.002	1.00	0.103 ± 0.004 *	2.06
1.25	0.060 ± 0.003	1.00	0.079 ± 0.002 *	1.58
0.625	0.060 ± 0.002	1.00	0.078 ± 0.004 *	1.56
0(CK)	0.060 ± 0.007	1.00	0.050 ± 0.011	1.00

表中数据为平均值 ± 标准误($n=9$)；比值 = 处理酶比活力/对照酶比活力；数据后星号表示处理与对照间差异显著($P<0.05$)；下同。Data are given as mean ± *SE* for 9 repeats, and the ratio = treatment/CK. The asterisk indicates significant difference between the treatment and the control ($P<0.05$). The same below.

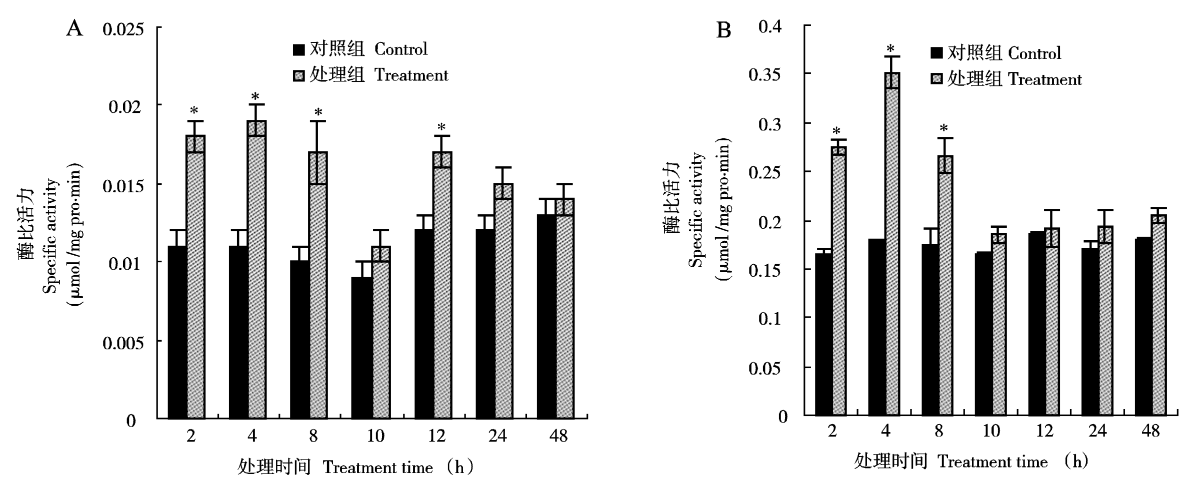


图 2　F3-28 处理不同时间后对粘虫 5 龄幼虫中肠类胰蛋白酶活性的影响

Fig. 2　Effect of F3-28 on trypsin-like protease activity in the midgut of 5th instar larvae of *Mythimna separata*

A：以 BAPNA 为底物 BAPNA as the substrate；B：以 TAME 为底物 TAME as the substrate.

表 2　不同浓度 F3-28 对粘虫 5 龄幼虫中肠类胰蛋白酶活性的影响

Table 2　Effect of F3-28 on trypsin-like protease activity in the midgut of 5th instar larvae of *Mythimna separata* at different concentrations

处理浓度 Treatment concentration (mg/mL)	以 BAPNA 为底物 BAPNA as the substrate		以 TAME 为底物 TAME as the substrate	
	酶比活力 Specific activity (μmol/mg pro·min)	比值 Ratio	酶比活力 Specific activity (μmol/mg pro·min)	比值 Ratio
5	0.012 ±0.001 *	1.33	0.111 ±0.005 *	1.59
2.5	0.012 ±0.002 *	1.33	0.092 ±0.003 *	1.31
1.25	0.010 ±0.001	1.11	0.071 ±0.009	1.01
0.625	0.010 ±0.001	1.11	0.071 ±0.003	1.01
0(CK)	0.009 ±0.001	1.00	0.070 ±0.002	1.00

表中数据为平均值 ± 标准误(n = 3)；比值 = 处理酶比活力/对照酶比活力；数据后星号表示处理与对照间差异显著(P < 0.05)；下同。Data are given as mean ± *SE* for 3 repeats, and the ratio = treatment/CK. The asterisk indicates significant difference between the treatment and the control (P < 0.05). The same below.

以 BTEE 为底物，粘虫幼虫处理后 2，4，8，10，12，24，48 h 的中肠类胰凝乳蛋白酶活性分别为对照组的 0.50，1.66，1.44，1.18，1.54，1.08，1.03 倍；处理 2 h 后，粘虫幼虫中肠类胰凝乳蛋白酶先是被抑制，4 h 后有一个激增(图 3)。

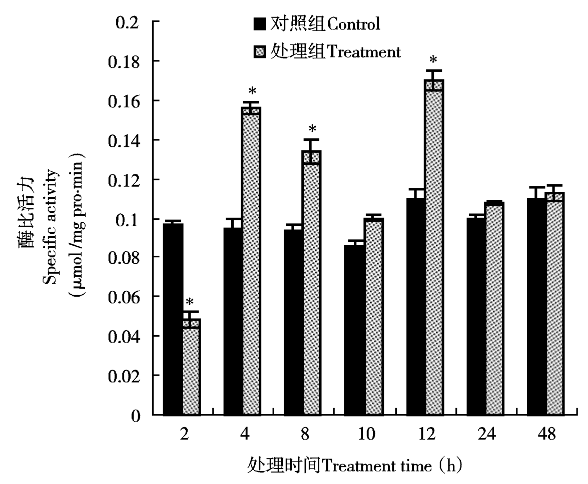


图 3　F3-28 处理不同时间后对粘虫 5 龄幼虫中肠类胰凝乳蛋白酶活性的影响

Fig. 3　Effect of F3-28 on chymotrypsin-like protease activity in the midgut of 5th instar larvae of *Mythimna separata*

不同浓度 F3-28 对粘虫 5 龄幼虫类胰凝乳蛋白酶活性的影响见表 3，类胰凝乳蛋白酶活性与处理浓度没有表现浓度依赖性。

2.3　F3-28 对小地老虎和粘虫幼虫脂肪酶活性的影响

由图 4(A)和图 4(B)可以看出，以 1 μg F3-28/头的剂量处理小地老虎和粘虫 5 龄幼虫，经 t 检验，不同时间间隔两种试虫中肠脂肪酶活性变化不显著。表 4 的结果说明不同浓度 F3-28 处理试虫，中肠脂肪酶活性变化也不显著。这些结果说明 F3-28 对粘虫和小地老虎幼虫体内的脂肪酶活性没有明显影响。

表 3　不同浓度 F3-28 对粘虫 5 龄幼虫中肠类胰凝乳蛋白酶活性的影响

Table 3　Effect of F3-28 on chymotrypsin-like protease activity in the midgut of 5th instar larvae of *Mythimna separata* at different concentrations

处理浓度 Treatment concentration (mg/mL)	酶比活力 Specific activity (μmol/mg pro·min)	比值 Ratio
5	0.047 ±0.001	1.15
2.5	0.049 ±0.006	1.20
1.25	0.038 ±0.002	0.93
0.625	0.043 ±0.004	1.05
0(CK)	0.041 ±0.001	1.00

2.4　F3-28 对小地老虎和粘虫幼虫淀粉酶活性的影响

由图 5(B)可知，经 1 μg F3-28/头的剂量处理 2，4，8，10，12，24 h 后，粘虫幼虫中肠淀粉酶活性分别为对照的 1.60，1.35，1.27，1.31，1.23，1.20 倍，而对小地老虎幼虫中肠淀粉酶的活性无明显影响(图 5：A)。表 5 结果表明，F3-28 对试虫体内淀粉酶活性的影响没有浓度依赖关系。

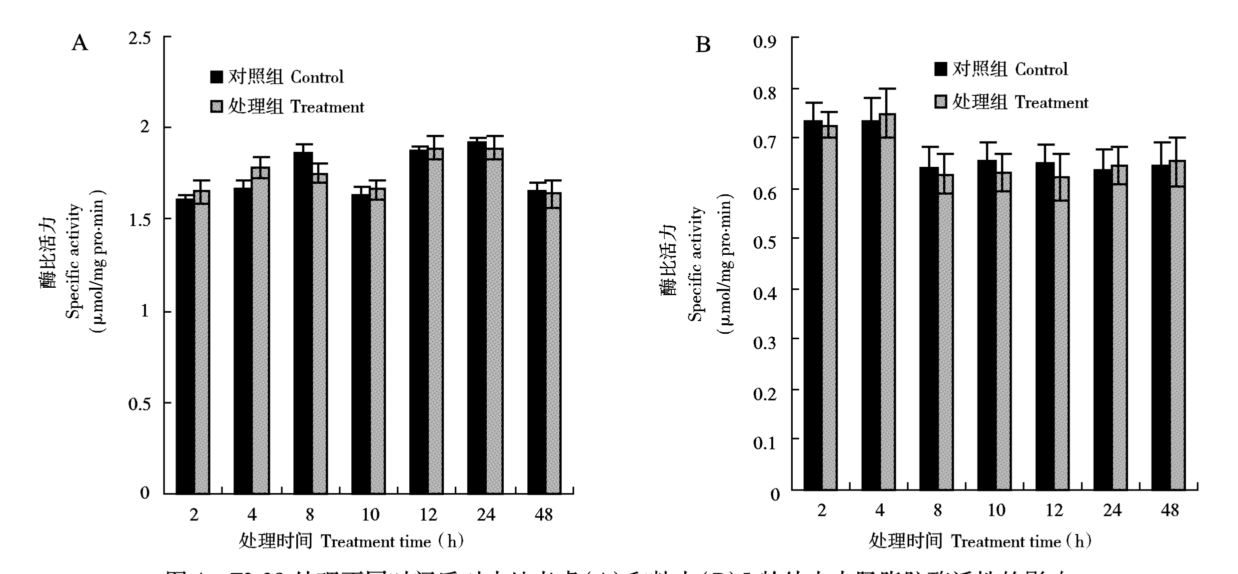


图 4　F3-28 处理不同时间后对小地老虎(A)和粘虫(B)5 龄幼虫中肠脂肪酶活性的影响

Fig. 4　Effect of F3-28 on lipase activity in the midgut of 5th instar larvae of *Agrotis ypsilon* (A) and *Mythimna separata* (B)

表 4　不同浓度 F3-28 对小地老虎和粘虫 5 龄幼虫中肠脂肪酶活性的影响

Table 4　Effect of F3-28 on lipase activity in the midgut of 5th instar larvae of *Agrotis ypsilon* and *Mythimna separata* at different concentrations

处理浓度 Treatment concentration (mg/mL)	小地老虎 *A. ypsilon* 酶比活力 Specific activity (μmol/mg pro・min)	小地老虎 *A. ypsilon* 比值 Ratio	粘虫 *M. separata* 酶比活力 Specific activity (μmol/mg pro・min)	粘虫 *M. separata* 比值 Ratio
5	0.525 ±0.087	1.00	1.97 ±0.052	1.02
2.5	0.537 ±0.030	1.02	1.97 ±0.053	1.02
1.25	0.528 ±0.102	1.00	1.98 ±0.190	1.03
0.625	0.536 ±0.093	1.02	1.91 ±0.073	0.99
0(CK)	0.526 ±0.097	1.00	1.93 ±0.063	1.00

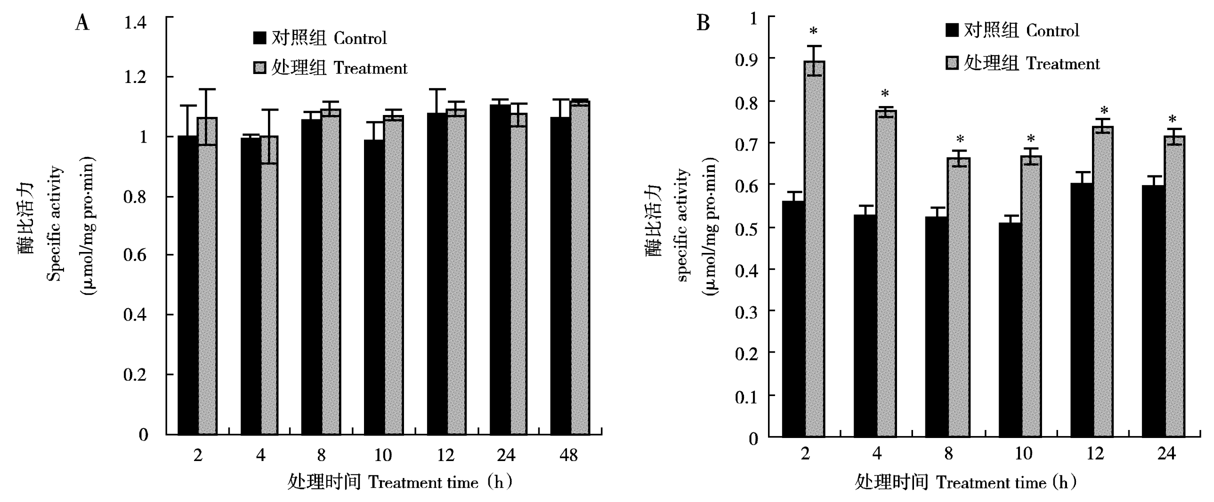


图 5　F3-28 处理不同时间后对小地老虎(A)和粘虫(B)5 龄幼虫中肠淀粉酶活性的影响

Fig. 5　Effect of F3-28 on amylase activity in the midgut of 5th instar larvae of *Agrotis ypsilon* (A) and *Mythimna separata* (B)

表 5　不同浓度 F3-28 对小地老虎和粘虫 5 龄幼虫中肠淀粉酶活性的影响

Table 5　Effect of F3-28 on amylase activity in the midgut of 5th instar larvae of *Agrotis ypsilon* and *Mythimna separata* at different concentrations

处理浓度 Treatment concentration (mg/mL)	小地老虎 *A. ypsilon*		粘虫 *M. separata*	
	酶比活力 Specific activity (μmol/mg pro · min)	比值 Ratio	酶比活力 Specific activity (μmol/mg pro · min)	比值 Ratio
5	0.544 ± 0.0293	0.99	0.947 ± 0.0124	1.09
2.5	0.546 ± 0.0165	1.00	0.939 ± 0.0220	1.09
1.25	0.544 ± 0.0335	0.99	0.873 ± 0.0101	1.01
0.625	0.550 ± 0.0344	1.00	0.889 ± 0.0112	1.03
0(CK)	0.548 ± 0.0125	1.00	0.865 ± 0.0090	1.00

3　讨论

3.1　F3-28 的作用机理可能涉及类胰蛋白酶的激活

研究结果表明，不敏感试虫小地老虎幼虫经杠柳根皮杀虫活性组分 F3-28 胃毒处理后，对试虫体内的主要消化酶蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活性无明显影响。敏感试虫东方粘虫幼虫，经 F3-28 胃毒处理后，试虫体内的蛋白酶活性显著提高，且和药剂浓度呈依赖关系；对试虫体内的淀粉酶亦有明显激活作用，但和药剂浓度无依赖关系，对脂肪酶活性没有显著影响。研究结果还表明，东方粘虫幼虫经 F3-28 胃毒处理后，试虫体内类胰蛋白酶及类胰凝乳蛋白酶均被激活，但对类胰蛋白酶的激活呈药剂浓度依赖关系，而对类胰凝乳蛋白酶的激活无药剂浓度依赖关系。考虑到 F3-28 对东方粘虫幼虫的选择毒杀活性、蛋白酶激活及中毒症状表现时间的一致性，特别是联想到人类有一种重要的疾病胰腺炎(pancreatitis)的发病机理:胰蛋白酶长时间被激活,胰腺组织被胰酶自身消化(织田敏次，1987)。笔者推测，杠柳根皮杀虫活性组分 F3-28 的作用机理可能和激活试虫体内蛋白酶，特别是激活类胰蛋白酶有关，高活性的类胰蛋白酶可能破坏了试虫的肠壁细胞，敏感试虫中肠瓦解，肠道内容物外溢，并最终导致其死亡。但这一推测尚需要进一步证实，F3-28 激活试虫体内类胰蛋白酶的机理亦需深入研究。

3.2　类胰蛋白酶激活剂可能成为新型杀虫剂

目前国内外报道的天然产物对昆虫消化酶系影响的研究，其思路都是寻找昆虫消化酶抑制剂。利用这些抑制剂抑制昆虫消化酶系，干扰消化生理，从而阻碍生长发育，抑制其对农作物的危害(王琛柱等，1995)。另一方面是将消化酶抑制剂的基因转入植物成为抗虫作物(Hilder *et al.*，1987)。与此相反，作者依据人类疾病胰腺炎的发病机理，致力于从天然产物中筛选蛋白酶，特别是类胰蛋白酶激活剂的研究，希望从中发现新的作用靶标，开发出一类能使昆虫患上“胰腺炎”的杀虫剂。

3.3　F3-28 活性成分的结构

本项研究中供试药剂 F3-28 是杠柳根皮提取物经 3 级硅胶柱层析后得到的一个杀虫馏分，经液相色谱分析，F3-28 包含 3 个杠柳新苷类化合物，至于是何种化合物激活了蛋白酶的活性，亦有待将这 3 个杠柳新苷类化合物完全分离并鉴定结构后才能确定。

参 考 文 献 (References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.

Broadway RM, Duffey SS, 1986. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 32(10): 827 – 833.

Cao HQ, Yue YD, Peng ZH, Hua RM, Tang F, 2006. Effects of bamboo extracts on the activities of several enzymes in *Helicoverpa armigera* larvae. *Scientia Silvae Sinicae*, 42(7): 145 – 148. [操海群，岳永德，彭镇华，花日茂，汤锋，2006. 竹提取物对棉铃虫幼虫体内几种酶系活性的影响. 林业科学，42(7): 145 – 148]

Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W, 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95(2): 271 – 278.

Fu CB, Zhang X, 2000. Effects of the extracts of Savin juniper, *Sabinna vulgaris* Ant. on the activities of several enzymes in *Mythimna*

separata Walker. *Acta Phytophylacica Sinica*, 27(1): 75－78.［付昌斌，张兴，2000. 砂地柏提取物对粘虫幼虫体内几种酶系活性的影响. 植物保护学报，27(1): 75－78］

Hilder VA, Gatehouse AM, Sheerman SE, Barker RF, Boulter D, 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330: 160－163

Li Y, 2006. Study on Insecticidal Constituents from *Periploca sepium* Bunge. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi.［李奕，2006. 杠柳杀虫活性成分研究. 陕西杨凌：西北农林科技大学硕士学位论文］

Liu WD, Qi ZO, 1983. Temphos induce anti-organic phosphorus *Culex fatiqans* esterase. *Contributions from Shanghai Institute of Entomology*, (3): 65－72.［刘维德，齐治欧，1983. 双硫磷诱导抗有机磷致乏库蚊酯酶活性的增强. 昆虫学研究集刊，(3): 65－72］

Oda T, 1987. Pancreopathy. Chongqing Press, Chongqing. 262－263.［织田敏次，1987，胰脏病. 重庆：重庆出版社. 262－263］

Sha CY, Bai C, Wen J, 1981. The role of the intestinal proteases of army worm *Leucania separata* Walker in the pathogenicity of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *kenyae* "7407". *Acta Entomologica Sinica*, 24(3): 237－243.［沙槎云，白成，温洁，1981. 粘虫肠道蛋白酶在苏云金杆菌肯尼亚变种"7407"晶体致病中的作用. 昆虫学报，24(3): 237－243］

Shi BJ, Liu J, Wei SP, Ji ZQ, Hu ZN, Wu WJ, 2009. Fragmentation pathway of periplocosides by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 11(1): 81－86.［师宝君，刘健，魏少鹏，姬志勤，胡兆农，吴文君，2009. 杠柳苷类化合物电喷雾多级质谱裂解行为研究. 农药学学报，11(1): 81－86］

Shi QH, Ma YM, Qin HQ, 2005. Preliminary study on chemical composition and insecticidal activity of root bark from *Periploca sepium*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 14(6): 141－144.［史清华，马养民，秦虎强，2005. 杠柳根皮化学成分及杀虫活性的初步研究. 西北农业学报，14(6): 141－144］

Stellmach B, 1992. Bestimmungsmethoden Enzyme. China Light Industry Press, Beijing. 29－32.［施特尔马赫，1992. 酶的测定方法. 北京：中国轻工业出版社. 29－32］

Telang M, Srinivasan A, Patankar A, Harsulkar A, Joshi V, Damle A, Deshpande V, Sainani M, Ranjekar P, Gupta G, Birah A, Rani S, Kachole M, Giri A, Gupta V, 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitor of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry*, 63(6): 643－652.

The Editorial Committee of Flora of Shanxi, 2000. Flora of Shanxi Vol. 3. Chinese Science and Technology Press, Beijing. 556－560.［山西植物志编辑委员会，2000. 山西植物志第 3 卷. 北京：中国科学技术出版社. 556－560］

Wang CZ, Qin JD, 1996. Partial characterization of protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 39(1): 7－14.［王琛柱，钦俊德，1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. 昆虫学报，39(1): 7－14］

Wang CZ, Xiang XF, Zhang SF, 1995. Effect of soybean trypsin inhibitor on the growth and digestive physiology of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 38 (3): 272－277.［王琛柱，项秀芬，张书芳，1995. 大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫消化生理和生长发育的影响. 昆虫学报，38(3): 272－277］

Zhang X, Zhao SH, 1992. Effects of toosendanin on several enzyme systems of the cabbage worm (*Fieris rapae* L.). *Acta Entomologica Sinica*, 35(2): 171－177.［张兴，赵善欢，1992. 川楝素对菜青虫体内几种酶系活性的影响. 昆虫学报，35(2): 171－177］

Zhao YC, 2008. Study on the Separation, Insecticidal Activity and Mechanism of Periplocoside. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi.［赵彦超，2008. 杠柳毒素 NW 的分离、杀虫活性及其作用机理初步研究. 陕西杨凌：西北农林科技大学硕士学位论文］

Zhu JS, Qiao XW, Wang J, Qin S, 2004. Study on antifeedant and insecticidal activities of extracts and fractions from *Periploca spepium* Bunge against *Plutella xylostella* (L.). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 6(2): 48－52.［朱九生，乔雄梧，王静，秦曙，2004. 杠柳的不同溶剂提取分离物对小菜蛾幼虫的拒食和毒杀作用. 农药学学报，6(2): 48－52］

（责任编辑：赵利辉）